

METHOD FOR DETERMINING QUINOLENE AGENT

Publication number: JP5203578

Publication date: 1993-08-10

Inventor: MATSUBAYASHI KYUICHI; YOSHIDA HISAMI

Applicant: DAIICHI SEIYAKU CO

Classification:

- **international:** G01N21/64; G01N21/78; G01N33/50; G01N33/52;
G01N21/64; G01N21/77; G01N33/50; G01N33/52;
(IPC1-7): G01N21/64; G01N21/78; G01N33/50;
G01N33/52

- **european:**

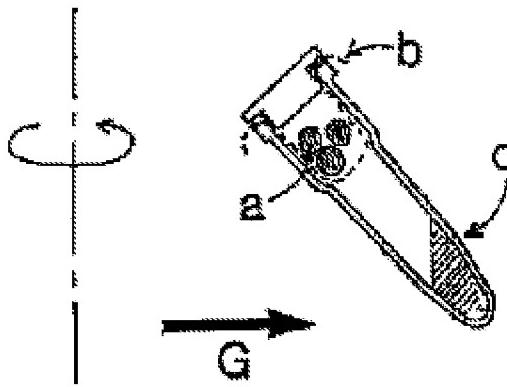
Application number: JP19920178826 19920527

Priority number(s): JP19920178826 19920527; JP19910225426 19910528

[Report a data error here](#)

Abstract of **JP5203578**

PURPOSE: To obtain result of monitoring in a short time without requiring a highly advanced equipment by measuring luminescence which is generated by casting an excitation light to specimen containing quinolene agent under acid conditions. **CONSTITUTION:** Keep 2-3 spherical absorbent waddings with a diameter which is approximately 5mm in a mouth, place the absorbent waddings (a) which fully contain saliva on a gauze (b) of a transparent sample tube (c), and then hold the gauze b, cover it with a lid, and then centrifuge it approximately for one minute, thus enabling a oral quinolene agent offxacine(OFLX) to be collected quantitatively. The OFLX is dissolved into 0.04M phosphor acid buffer liquid (pH3) with a concentration of 10μg/ml and then a saliva sample with pH3 whose fluorescent concentration is maximized is prepared. When a fluorescent lamp is cast to the saliva sample, color tone changes from a deep blue color due to reflection of illumination light to a yellow green color which can be distinguished vividly, thus enabling detection sensitivity of the quinolene agent to be enhanced when observing with naked eyes.



Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-203578

(43)公開日 平成5年(1993)8月10日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	府内整理番号	F I	技術表示箇所
G 01 N 21/78	C	7906-2 J		
21/64	Z	9115-2 J		
33/50	G	7055-2 J		
33/52	C	7055-2 J		

審査請求 未請求 請求項の数7(全10頁)

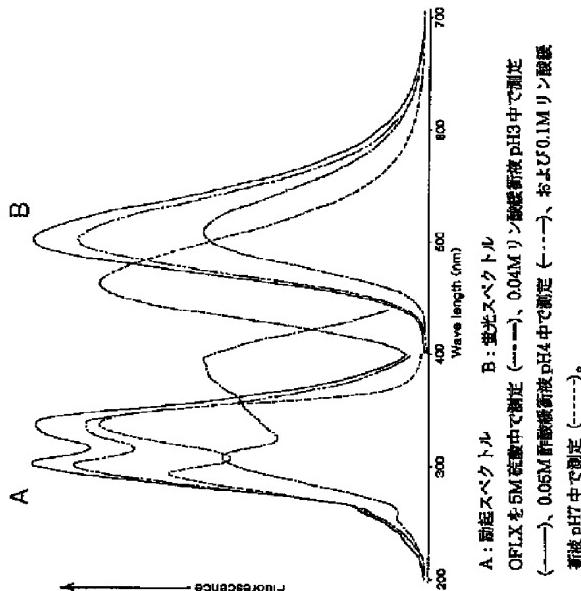
(21)出願番号	特願平4-178826	(71)出願人	000002831 第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋3丁目14番10号
(22)出願日	平成4年(1992)5月27日	(72)発明者	松林 久一 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内
(31)優先権主張番号	特願平3-225426	(72)発明者	吉田 久美 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社東京研究開発センター内
(32)優先日	平3(1991)5月28日		
(33)優先権主張国	日本 (JP)		

(54)【発明の名称】 キノロン剤の定量法

(57)【要約】

【目的】 キノロン剤の定量に関する。

【構成】 キノロン剤を含有する被検体を酸性条件下で励起光を照射し、結果として生ずる蛍光を測定するキノロン剤の定量法である。酸性時、最大蛍光波長が490から550 nm付近であるキノロン剤であれば肉眼でも観察可能である。唾液を酸性条件下、この方法で測定することにより、キノロン剤のモニタリングが可能である。



1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 キノロン剤を含有する被検体を酸性条件下で、励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定することを特徴とするキノロン剤の定量法。

【請求項2】 酸性時、最大蛍光波長が490nmから550nm付近であることを特徴とする請求項1記載のキノロン剤の定量法。

【請求項3】 唾液を酸性条件下で、励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定することを特徴とする唾液中キノロン剤の定量法。

【請求項4】 ピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤を含有する唾液を酸性条件下で、励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定することを特徴とするキノロン剤の定量法。

【請求項5】 ピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤が、9-フルオロ-3-メチル-10-(4-メチル-1-ピペラジニル)-7-オキソ-2, 3-ジヒドロ-7H-ピリド [1, 2, 3-dc] [1, 4] ベンゾオキサジン-6-カルボン酸である請求項4記載のキノロン剤の定量法。

【請求項6】 ピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤が、S-(+)オキソ-2, 3-ジヒドロ-7H-ピリド [1, 2, 3-de] [1, 4] ベンゾオキサジン-6-カルボン酸である請求項4記載のキノロン剤の定量法。

【請求項7】 ピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤が、10-(8-(S)-アミノ-6-アザスピロ[3, 4]オクタン-6-イル)-9-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-3-(S)-メチル-7-オキソ-7H-ピリド [1, 2, 3-de] [1, 4] ベンゾオキサジン-6-カルボン酸である請求項4記載のキノロン剤の定量法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はキノロン剤の定量法に関する。

【0002】

【発明の背景】 化学構造上キノロン核の6位（または、その相当位）にフッ素、7位にピペラジン環及びピロリジン環などを有するような誘導体、いわゆるキノロン剤は広域抗生物質として広く使用されている。そのうち、9-フルオロ-3-メチル-10-(4-メチル-1-ピペラジニル)-7-オキソ-2, 3-ジヒドロ-7H-ピリド [1, 2, 3-de] [1, 4] ベンゾオキサジン-6-カルボン酸（特開昭57-46986号）つまり経口キノロン剤オフロキサシン（以下OFLXと略す）は、ヒト体内ではほとんど代謝を受けず、主として未変化体で尿中に排泄されることから、非常に投与設計をし易い薬物として認められている。最近は、高齢者、特に腎機能不全患者に処方される機会も増加している。

しかしOFLXが腎排泄型であり、腎機能が低下している患者については投与設計の修正と血液中濃度のモニタリングが必要であることが分かってきた。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 キノロン剤のモニタリングは高級な機器を必要とせず、ベットサイドで短時間で結果を得られる必要がある。

【0004】

【課題を解決するための手段】 キノロン剤の多くは400～500nm付近の蛍光を発するので、その蛍光を測定すればよい。更に、サンプルに励起光を照射した時、ある条件で蛍光波長が長波長側に移る場合、肉眼に対し明度が高くなり肉眼で蛍光観察可能な検出感度が得られると考える。これを応用すれば血中、尿中、唾液中濃度の測定が十分でき、その測定も蛍光光度計でなく肉眼での標準サンプルとの比較を行うことで可能と考える

【0005】 OFLXはその構造において3位が不育炭素であり、通常の製法ではラセミ体（(±)体比旋光度 $[\alpha]D = 0^\circ$ ）として得られる。この光学活性体3S体（(-)体）が（+）体の約2倍の抗菌活性を有するとともに（+）体に比べて毒性が低いことが知られている（特開昭62-252790号）。この光学活性体、S-(-)-9-フルオロ-3-メチル-10-(4-メチル-1-ピペラジニル)-7-オキソ-2, 3-ジヒドロ-7H-ピリド [1, 2, 3-de] [1, 4] ベンゾオキサジン-6-カルボン酸（DR-3355と略す）も同じように定量ができる。さらに、キノロン核の7位にピロリジン環を有するキノロン剤の1つ、10-(8-(S)-アミノ-6-アザスピロ[3, 4]オクタン-6-イル)-9-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-3-(S)-メチル-7-オキソ-7H-ピリド [1, 2, 3-de] [1, 4] ベンゾオキサジン-6-カルボン酸（DV-7751と略す）（特開平3-95176）も同じように定量できる。

【0006】 つまり、酸性で、更に好ましくはpH3～4で、OFLXの蛍光波長が他のキノロン剤（シプロフロキサシン、ノルフロキサシンなど）に比較して長波長側にあるのが肉眼で蛍光観察可能な明度を高くすることに寄与しており、キノロン骨格の8位に結合している酸素原子の lone pair 電子が芳香環の共鳴構造に関与していると考えられるので、同構造を有するDR-3355およびDV-7751も定量可能である。

【0007】 経口キノロン剤の一つ、OFLXの唾液中濃度が血清中濃度に良く相関している（一原規方ら、Chemotherapy (Tokyo), 32, 118-149, (1984) ことから、唾液中OFLX濃度を検出することにより十分血中濃度モニタリング法となり得る。

【0008】 ここに発明者は、研究を重ねた結果、キノロン剤を含有する被検体を酸性条件下で、蛍光ランプ等

3

4

を照射源として励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定するキノロン剤の定量法を完成した。この時、キノロン剤の蛍光の最大蛍光波長が、酸性時490 nmから550 nm付近であれば肉眼観察でも定量が出来ることを見出した。さらに唾液を酸性条件下で、励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定する唾液中キノロン剤の定量法を完成した。

【0009】

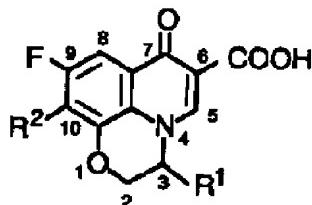
【発明の構成】本発明は、キノロン剤を含有する被検体を酸性条件下で励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定することを特徴とするキノロン剤の定量法を提供するものである。この測定の際、酸性時、最大蛍光波長が490 nmから550 nm付近であれば、肉眼観察などでも定量が可能な定量法である。

【0010】キノロン剤を含有する被検体としては、血液、尿、唾液等が挙げられ、このうち、唾液を酸性条件下で、励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定することを特徴とする唾液中キノロン剤の定量法は、キノロン剤のモニタリングを行う上で有用な定量法を提供する。

【0011】本発明の定量法はキノロン剤、とりわけピリドベンゾオキサジン骨格を有するものに有用である。この様なキノロンとしては次の一般式の構造を有するものを挙げることができる（なお、3位における配置に関してはR S配置のものによって代表させているが、S配置（β配置）のものも含まれる。）。

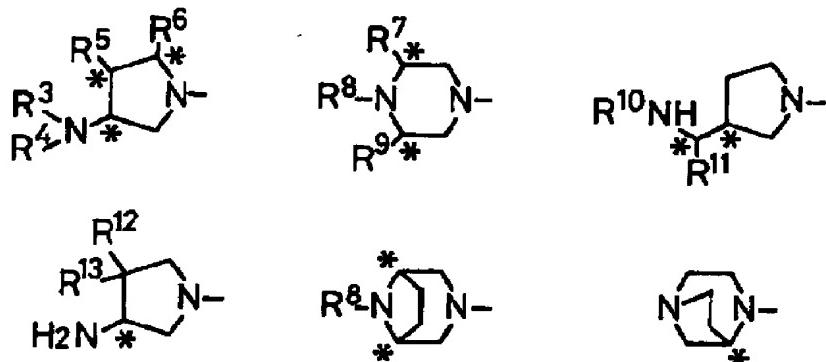
【0012】

【化1】



【0013】式中、R¹は低級アルキル基を意味し、特にメチル基が好ましい。この部位の立体配置はS配置の方が薬理活性の点で好ましいことが既に判明している。

【0014】R²は飽和含窒素複素環置換基を意味す*



(式中、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁸、R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁴、R¹⁵、R¹⁶、R¹⁷およびR¹⁸は独立して水素原

*る。環の大きさは4員環から7員環が好ましく、特に5員環および6員環が好ましい。またオキサゾリジン、モルホリン、チアゾリジン、チオモルホリン、イミダゾリジン、ピラゾリジン、ピペラジンの如く環の構成原子として酸素原子、硫黄原子または複数の窒素原子を含んでもよい。飽和含窒素複素環置換基としては、ピロリジニル基およびピペラジニル基が特に好ましく、これらはさらに置換基を有していてもよい。この際、立体異性的に単一な置換基となっているのが好ましい。

【0015】この様な置換基としては、①置換基を有することもあるアミノ基、②置換基を有することもあるアミノアルキル基、③5-置換-2-オキソ-1,3-ジオキソール-4-イルメチル基、あるいは④水酸基などの極性基、また、⑤炭素数1から6の直鎖状、分枝状あるいは環状のアルキル基を挙げができる。また、極性基の場合は炭素数1から6のアルケレン基を介して飽和含窒素複素環置換基に結合してもよい。ここで、アミノ基の置換基としては例えばアルキル基やアシル基、そしてアシルオキシカルボニル基等を挙げができる。

【0016】上述の極性基としては、無置換のアミノ基、アミノメチル基、1-アミノエチル基および水酸基が特に好ましい。

【0017】また飽和含窒素複素環置換基上のアルキル基としては、メチル基、エチル基、プロピル基およびイソプロピル基、またgem-ジメチル基およびgem-ジエチル基等、そしてさらにこれらがシクロプロパン環やシクロブタン環を形成してスピロ環系となつた飽和含窒素複素環置換基となるのも好ましい。また、4から7員環の飽和含窒素複素環置換基が架橋されていて、ビシクロ環状の飽和含窒素複素環置換基となっていてもよい。

【0018】これらの飽和含窒素複素環置換基のうち、特にアミノ基で置換されたもの、あるいは第2の窒素原子を有するものの例ととしては次の構造のものを示すことができる。

【0019】

【化2】

子または炭素数1から6のアルキル基を意味し、またR^{1,2}とR^{1,3}とが結合してポリメチレン鎖を形成し、3員環から6員環を形成してもよい。)

【0020】これらの置換基の具体例としては、3-アミノピロリジニル基、3-メチルアミノピロリジニル基、3-ジメチルアミノピロリジニル基、3-エチルアミノピロリジニル基、3-プロピルアミノピロリジニル基、3-イソプロピルアミノピロリジニル基、3-アミノ-4-メチルピロリジニル基、4-アミノ-2-メチルピロリジニル基、4-アミノ-2, 3-ジメチルピロリジニル基、3-メチルアミノ-4-メチルピロリジニル基、4-ジメチルアミノ-2-メチルピロリジニル基、4-ジメチルアミノ-2, 3-ジメチルピロリジニル基、3-メチルピペラジニル基、4-メチルピペラジニル基、3, 4-ジメチルピペラジニル基、3, 5-ジメチルピペラジニル基、3-エチル-3, 5-ジメチルピペラジニル基、4-イソプロピル-3, 5-ジメチルピペラジニル基、3-アミノメチルピロリジニル基、3-メチルアミノメチルピロリジニル基、3-(1-アミノ)エチルピロリジニル基、3-(1-メチルアミノ)エチルピロリジニル基、3-(1-エチルアミノ)エチルピロリジニル基、3-(1-アミノ)プロピルピロリジニル基、3-(1-メチルアミノ)プロピルピロリジニル基、3-アミノピロリジニル基、4-アミノ-3, 3-ジメチルピロリジニル基、7-アミノ-5-アザスピロ[2, 4]ヘプタン-5-イル基、8-アミノ-6-アザスピロ[3, 4]

オクタン-6-イル基、1, 4-ジアザビシクロ[3, 2, 1]オクタン-4-イル基、3, 8-ジアザビシクロ[3, 2, 1]オクタン-3-イル基、8-メチル-3, 8-ジアザビシクロ[3, 2, 1]オクタン-3-イル基、8-エチル-3, 8-ジアザビシクロ[3, 2, 1]オクタン-3-イル基等を挙げることができる。

【0021】また、アミノ基以外の置換基を有する飽和含窒素複素環置換基として例えば、3-ハイドロキシピロリジニル基、3-メルカプトピロリジニル基、3-ハイドロキシ-4-メチルピロリジニル基、3-メルカプト-4-メチルピロリジニル基、モルホリノ基、チオモルホリノ基、2-メチルモルホリノ基、2-メチルチオモルホリノ基、2, 6-ジメチルモルホリノ基、2, 6-ジメチルチオモルホリノ基、2, 2-ジメチルモルホリノ基、2, 2-ジメチルチオモルホリノ基等を挙げることができる。

【0022】本発明はピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤を含有する唾液を酸性条件下で、励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定することを特徴と

するキノロン剤の定量法を提供し、さらにピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤として、9-フルオロ-3-メチル-10-(4-メチル-1-ピペラジニル)-7-オキソ-2, 3-ジヒドロ-7H-ピリド[1, 2, 3-d]e] [1, 4]ベンゾオキサジン-6-カルボン酸、S-(-)オキソ-2, 3-ジヒドロ-7H-ピリド[1, 2, 3-d]e] [1, 4]ベンゾオキサジン-6-カルボン酸、及び10-(8-(S)-アミノ-6-アザスピロ[3, 4]オクタン-6-イル)-9-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-3-(S)-メチル-7-オキソ-7H-ピリド[1, 2, 3-d]e] [1, 4]ベンゾオキサジン-6-カルボン酸のキノロン剤の定量法を提供するものである。

【0023】以下実施例で詳しく説明する。

【0024】

【実施例1】 唾液の採取法

A法-脱脂綿をちぎって直径約5mmの球形に軽く丸めたものを、2-3個口に含み軽く噛んで唾液を十分含ませた。この時脱脂綿と一緒に飴、クエン酸などを口に含んだ場合も検討した。ピンセットで脱脂綿を取り出し、予め図1に示すごとくガーゼをセットした透明サンプルチューブ(ポリスチレン製、アシスト製、No. 17. 452. 722)のガーゼの上にのせ、ガーゼを挟んで止めるように蓋をし、簡易型遠心機(チビタン、日本ミリポア製)で約1分間遠心分離した。

【0025】B法-OFLXの回収率測定等の目的には、健常成人男子より試験管に直接唾液を採取した。

【0026】唾液の採取法としては最も簡単な方法はB法であるが、採取される者にとっては苦痛であり、短時間に必要量の唾液を採取するためにはある程度熟練を必要とする。一原らはbioassayのペーパーディスクを口に含ませ唾液を採取している(一原規方ら、Chemotherapy(Tokyo), 32, 118-149, (1984))。この方法は比較的簡単であるが蛍光検出に必要な量が採取できず、また濾紙からの回収が難しい。A法では採取される者にほとんど苦痛を与えることなく、容易に0.3ml程度を短時間に得ることができた。唾液を採取する際に飴、クエン酸などを一緒に口に含むことによりさらに唾液の分泌は促進され、採取が容易であった。この方法で採取した唾液の性状は、直接試験管に採取した唾液とは少し異なり、比較的唾液特有の粘度の高い蛋白が少なかった。

【0027】

【実施例2】 蛍光観察条件の検討

OFLXを種々のpHの溶液(溶媒1:0.1Mリン酸緩衝液(pH 7.0)、2:0.05M酢酸緩衝液(pH 4.0)、3:0.04Mリン酸緩衝液(pH 3)、4:5M硫酸)に10μg/mlの濃度で溶解し、日立650-60型分光蛍光光度計(日立製作所)で蛍光スペクトルを測定した。測定に際してpH 7の溶

液でプレスキャンを行って分光蛍光光度計の感度を規格化し、以後この感度でサンプルを測定した。結果を図2に示す。

【0028】蛍光性の化合物は一般にその解離状態の違いにより蛍光の波長、強度が異なることが知られている。OFLXについてはpHが7から4に変化する時、励起スペクトルはあまり変化しないが、蛍光スペクトルは40nmも長波長にシフトした。これ以上酸性側にしても蛍光スペクトルはこれからあまり変化せず、また蛍光強度はpH3で最大となり、それよりも酸性側では減少した。

【0029】このような蛍光スペクトルの変化は肉眼では蛍光の色調の変化として観察され、pH7での深青色から酸性領域での黄緑色に変化した。この変化に伴って肉眼で感じる明度が酸性側で著しく増大した。従って唾液サンプルをpH3にして蛍光ランプ(UVGL-25型、UVP, Inc. CA, USA)で照射すると、蛍光ランプの照射光の反射による深青色から明瞭に区別できる黄緑色へ変化し、肉眼で観察する場合、キノロン剤検出の感度を上げ信頼性を高めることができた。

【0030】

【実施例3】 標準添加サンプルの作成

実施例2のB法で採取した唾液を0.2mlずつ透明サンプルチューブにとりOFLXの水溶液(濃度: 4, 10, 20, 40, 100μg/ml)の10μlを加え良く混和し、OFLXの濃度0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0μg/mlの各サンプルとした。これに0.04Mリン酸緩衝液(pH3)0.2mlを加え混和し、簡易型遠心機で約10分間遠心分離して蛋白を沈澱させた。サンプルチューブを黒ケントラシャ紙を背景にして蛍光ランプ(UVGL-25型、UVP, Inc.

* c. CA, USA)で照射して蛍光を肉眼で観察した。図3に結果を示す。図3よりOFLXの濃度は肉眼で定量的に検出でき、唾液中濃度0.2μg/mlでも検出できた。肉眼での検出限界は個人差はあると考えられるが、0.2μg/ml程度であった。

【0031】ヒトにOFLXを100mg 経口単回投与した場合投与後2時間で唾液中濃度が0.4-0.7μg/mlとされている(一原規方ら、Chemotherapy (Tokyo), 32, 118-149, (1984))。また12時間毎に200mgを連投した場合、2回目投与直前の血漿中濃度が0.53μg/ml、5回目投与直前の濃度は1.19μg/mlであると報告されている(Couraud, L.ら、Drugs, 34, (Suppl. 1), 37-38, (1987))。この時の唾液中濃度は血漿中濃度と同程度と予想されるので上記の検出感度でモニター可能である。投与量を増加した場合にはこれよりも高い唾液中濃度となることが予想され、肉眼での検出感度は、臨床でOFLXの蓄積を予防する目的で使用するためには十分な感度である。

【0032】実施例2のB法で採取した唾液1mlに、OFLX溶液を加え0.5~0.004μg/mlとさらに0.04Mリン酸緩衝液(pH3)4mlを加えてサンプルを調整しUV-クレードのメタクリレートキュベット(Adrich社カタログNo. Z18801-8)に入れ、日本分光FP777型分光蛍光光度計で測定した。励起波長に303nm、330nmおよび360nm、蛍光波長に500nmを使用した時の結果は表1のごとくであった。

【0033】

【表1】

唾液中OFLX濃度 (μg/ml)	蛍光強度(出力表示)		
	303 nm	330 nm	360 nm
0.000	13.84	6.576	5.823
0.004	67.66	31.94	14.74
0.02	309.3	148.5	58.66
0.1	1471	714.1	273.5
0.5	6921	3445	1328
(r: 相関係数)	r=0.999939	r=0.999981	r=0.999995

【0034】

【実施例4】 回収率の測定

実施例1のB法により採取した唾液にOFLXを5μg/mlの濃度に溶解した。この溶液を脱脂綿に含ませて透明サンプルチューブの内筒にいれ遠心し濾液を得た。この濾液および元の唾液中のOFLX濃度をHPLC法

(Matsubayashi K.ら、Journal of Chromatography, 495, 354-357 (1989))により測定し、脱脂綿による吸収、回収による操作の回収率を求めた。

【0035】なお、励起スペクトルの測定には最大蛍光波長で検出し、蛍光スペクトルの測定には最大励起波

長で励起して行なった。

【0036】表1に示される様に、OFLXの回収率が $93.5 \pm 5.4\%$ であった。つまり唾液を脱脂綿に吸収させ、遠心分離により回収する方法（実施例1のA*）

回収率の測定

試行回数	1	2	3	平均
回収%	102.8	95.6	110.7	93.4 ± 5.4

【0038】

【実施例5】 DR-3355の定量

DR-3355を定量するには次のように行なえばよい。

【0039】実施例1のA法に従って唾液を分離する。唾液 0.2mL に $0.1\text{mL}\ 0.04\text{M}$ リン酸緩衝液（pH3）を加え酸性条件とする。一方、実施例3に従って、標準添加サンプルを作成する。サンプルチューブを黒ケントラシャ紙を背景として蛍光ランプで照射し肉眼で蛍光を観察する。標準添加サンプルの蛍光と比較して、DR-3355の唾液濃度を決める。

【0040】また、実施例1以外にも毛細管、スポットなどで唾液を採取することも可能である。最終數十 μl あればサランラップなどの上に水滴として載せ観察を肉眼で行なうことができる。よって、唾液も約數十 μl あれば定量ができる。酸性条件下の観察も少量であればサランラップ上での水滴形成やガラス板2枚の間の細いスリットにサンプルを入れるなどし、黒ラシャ紙をサランラップやガラス板の下に敷き蛍光ランプで照射することにより、キノロン剤の唾液中蛍光を観察し、標準サンプルと比較することで定量が可能である。

【0041】

【実施例6】他の経口キノロン剤の蛍光観察条件の検討-1

実施例2と同様に、10-(4-アミノ-3,3-ジメチル-1-ピロリジニル)-9-フルオロ-2,3-ジヒドロ-3-(S)-3-メチル-7-オキソ-7H-ピリド[1,2,3-de][1,4]-ベンゾオキサジン-6-カルボン酸(DV-7777と略す)を2種のpHの溶液、1. 0. 1Mリン酸緩衝液(pH7.0)または2. 0. 04Mリン酸緩衝液(pH3)に $2\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に溶解し、日立650型分光蛍光光度計で蛍光スペクトルを測定した。測定の都度プレスキャンを行って分光蛍光光度計の感度を規格化した。結果を図4に示す。

【0042】DV-7777はOFLXと同じようにpHが7から3に変化する時、励起スペクトルはあまり変化しないが、蛍光スペクトルは40nmも長波長にシフトした。

【0043】このような蛍光スペクトルの変化は肉眼で

10
*法)では、定量的にOFLXが回収された。

【0037】

【表2】

は蛍光の色調の変化として観察され、pH7での深青色から酸性領域で黄緑色に変化した。この変化に伴って肉眼で感じる明度が酸性側で著しく増大した。

【0044】更に、酸性条件下にして蛍光ランプで照射し、肉眼による検出限界を測定したところ、 $0.1\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。これはOFLXの場合よりやや感度がよいか同等であった。

【0045】

【実施例7】他の経口キノロン剤の蛍光観察条件の検討-2

実施例2と同様に、10-(8-(S)-アミノ-6-アzasピロ[3,4]オクタン-6-イル)-9-フルオロ-2,3-ジヒドロ-3-(S)-3-メチル-7-オキソ-7H-ピリド[1,2,3-de][1,4]-ベンゾオキサジン-6-カルボン酸(DV-7751)を2種のpHの溶液、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)または0.04Mリン酸緩衝液(pH3)に $1\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に溶解し、日立650型分光蛍光光度計で蛍光スペクトルを測定した。測定の都度プレスキャンを行って分光蛍光光度計の感度を規格化した。結果を図5に示す。

【0046】DV-7751はDV-7777と同じようにpHが7から3に変化する時、励起スペクトルはあまり変化しないが、蛍光スペクトルは45nmも長波長にシフトした。この蛍光スペクトルの変化もDV-7777と同様であった。酸性条件下にして蛍光ランプで照射し、肉眼による検出限界を測定したところ、 $0.2\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。

【0047】

【発明の効果】この定量法は短時間、5分程度で結果を知ることができ、ベッドサイドにおいて迅速に需要に対応できる。操作も、患者に脱脂綿を口に含ませ、取り出して緩衝液を加え酸性とし蛍光強度を測定するだけである。肉眼観察を行ない測定を行なう場合、設備において蛍光ランプだけで充分である。従って臨床のベッドサイドで迅速に測定し、投与量を考慮、調整する目的に応えられる。

【0048】

【図面の簡単な説明】

【図1】第1図は、唾液サンプルの分離法の説明図であ

る。

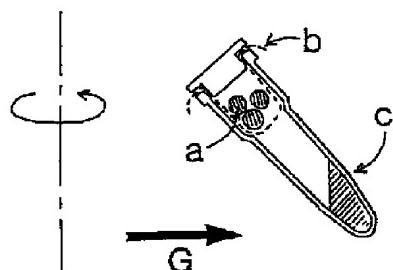
【図2】第2図は、OFLXの励起スペクトルと蛍光スペクトルの図である。

【図3】第3図は、唾液中OFLX標準サンプルの蛍光強度を示す図である。

【図4】第4図は、DV-7777の励起スペクトルと蛍光スペクトルの図である。

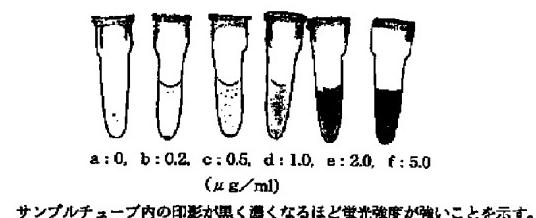
【図5】第5図は、DV-7751の励起スペクトルと蛍光スペクトルの図である。

【図1】



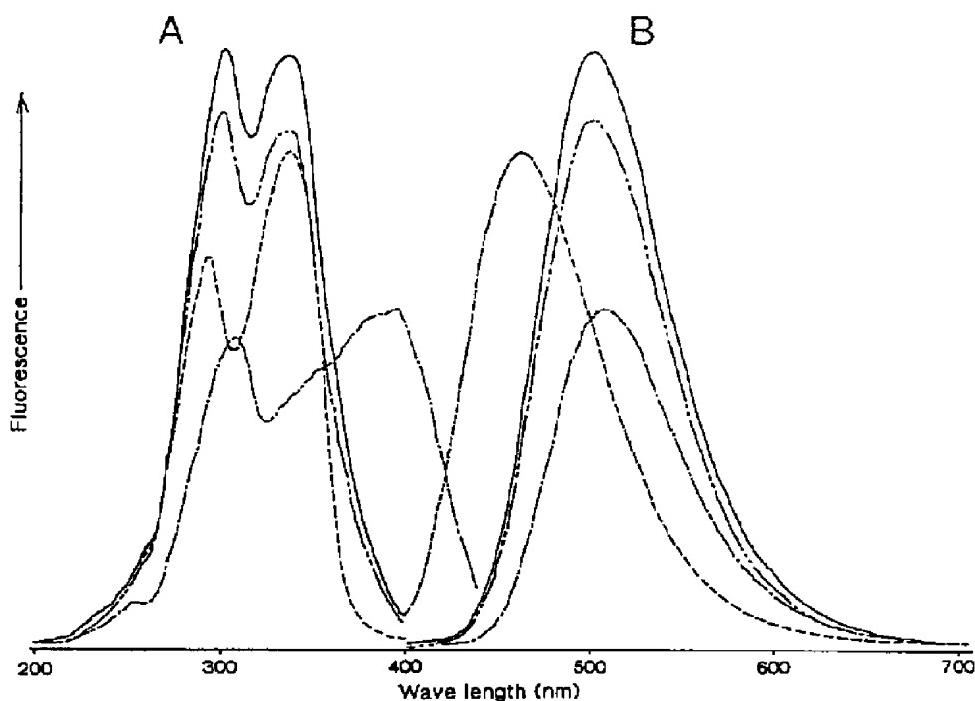
a: 脱脂綿 b: ガーゼ c: サンプルチューブ G: 重心力

【図3】



サンプルチューブ内の印影が黒く濃くなるほど蛍光強度が強いことを示す。

【図2】



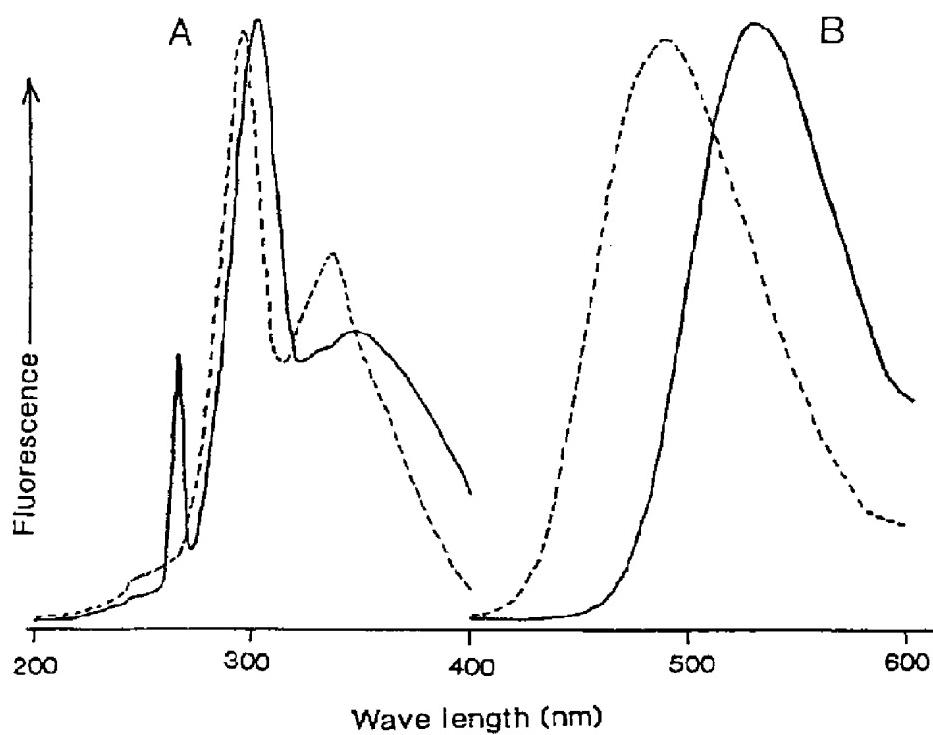
A : 励起スペクトル

B : 蛍光スペクトル

OFLX を 5M 硫酸中で測定 (---)、0.04M リン酸緩衝液 pH3 中で測定

(—)、0.05M 酢酸緩衝液 pH4 中で測定 (- - -)、および 0.1M リン酸緩衝液 pH7 中で測定 (- · - -)。

【図4】

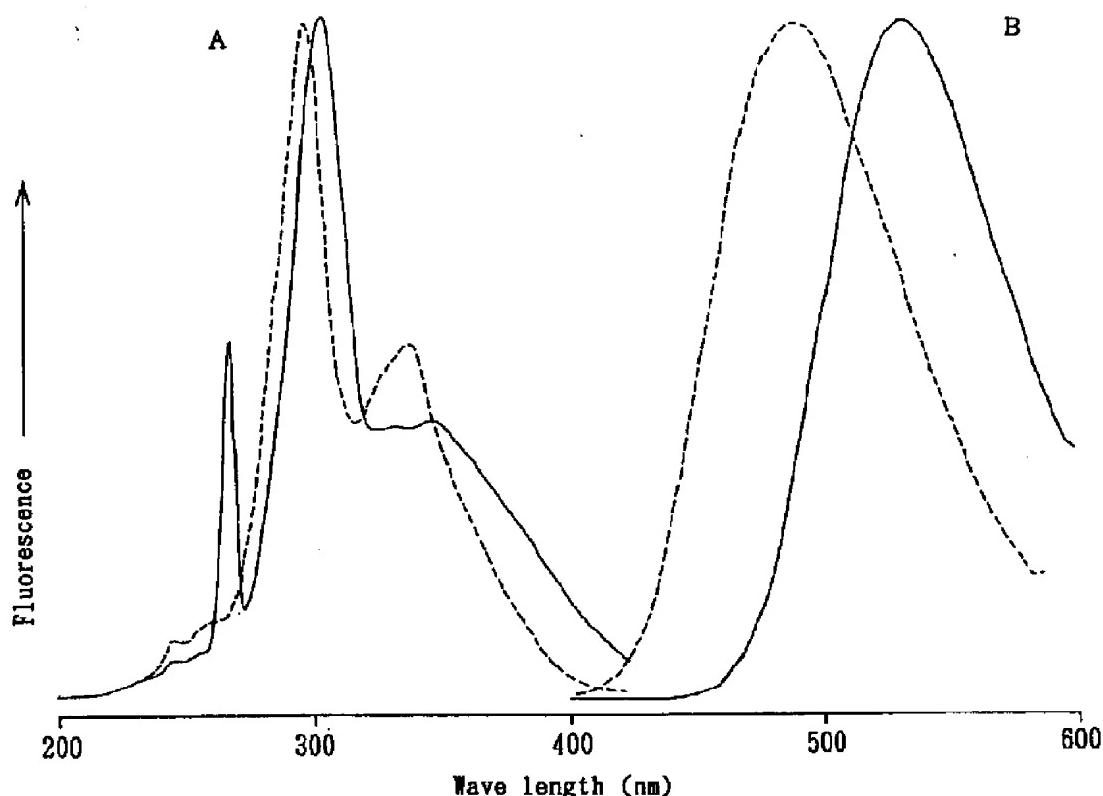


A : 励起スペクトル

B : 蛍光スペクトル

0.04M リン酸緩衝液 pH3 中で測定 (—) および 0.1M リン酸緩衝液 pH7 中
で測定 (----)。

【図5】



A: 励起スペクトル B: 蛍光スペクトル
0.04Mリン酸緩衝液pH3中で測定(——)および0.1Mリン酸緩衝液pH7中で
測定(- - -)。

【手続補正書】

【提出日】平成4年7月1日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 キノロン剤を含有する被検体を酸性条件下で、励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定することを特徴とするキノロン剤の定量法。

【請求項2】 酸性時、最大蛍光波長が490 nmから550 nm付近であることを特徴とする請求項1記載のキノロン剤の定量法。

【請求項3】 唾液を酸性条件下で、励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定することを特徴とする唾液中キノロン剤の定量法。

【請求項4】 ピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤を含有する唾液を酸性条件下で、励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定することを特徴とするキノロン剤の定量法。

【請求項5】 ピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤が、9-(フルオロ-3-メチル-10-(4-メチル-1-ピペラジニル)-7-オキソ-2,3-ジヒドロ-7H-ピリド [1, 2, 3-d] [1, 4] ベンゾオキサジン-6-カルボン酸である請求項4記載のキノロン剤の定量法。

【請求項6】 ピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤が、S-(-)-9-(フルオロ-3-メチル-10-(4-メチル-1-ピペラジニル)-7-オキソ-2,3-ジヒドロ-7H-ピリド [1, 2, 3-d] [1, 4] ベンゾオキサジン-6-カルボン酸である請求項4記載のキノロン剤の定量法。

【請求項7】 ピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤が、10-(8-(S)-アミノ-6-アザスピロ[3,4]オクタン-6-イル)-9-フルオロ-2,3-ジヒドロ-3-(S)-メチル-7-オキソ-7H-ピリド [1, 2, 3-d e] [1, 4] ベンゾオキサジン-6-カルボン酸である請求項4記載のキノロン剤の定量法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0022

【補正方法】変更

【補正内容】

【0022】本発明はピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤を含有する唾液を酸性条件下で、励起光を照射し結果として生ずる蛍光を測定することを特徴とするキノロン剤の定量法を提供し、さらにピリドベンゾオキサジン骨格を有するキノロン剤として、9-フルオロ-3-メチル-10-(4-メチル-1-ピペラジニル)-7-オキソ-2,3-ジヒドロ-7H-ピリド [1, 2, 3-d e] [1, 4] ベンゾオキサジン-6

-カルボン酸、S-(-)9-フルオロ-3-メチル-10-(4-メチル-1-ピペラジニル)-7-オキソ-2,3-ジヒドロ-7H-ピリド [1, 2, 3-d e] [1, 4] ベンゾオキサジン-6-カルボン酸、及び10-(8-(S)-アミノ-6-アザスピロ[3,4]オクタン-6-イル)-9-フルオロ-2,3-ジヒドロ-3-(S)-メチル-7-オキソ-7H-ピリド [1, 2, 3-d e] [1, 4] ベンゾオキサジン-6-カルボン酸のキノロン剤の定量法を提供するものである。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0036

【補正方法】変更

【補正内容】

【0036】表2に示される様に、OFLXの回収率が93.5±5.4%であった。つまり唾液を脱脂綿に吸収させ、遠心分離により回収する方法（実施例1のA法）では、定量的にOFLXが回収された。